

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Bettina MOECKEL et al

SERIAL NO: New U.S. Application

FILED: Herewith

FOR: NUCLEOTIDE SEQUENCES CODING FOR THE *lysR1* GENE

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

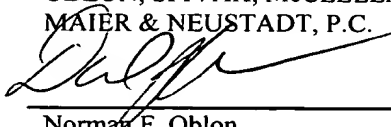
| <u>COUNTRY</u> | <u>APPLICATION NUMBER</u> | <u>MONTH/DAY/YEAR</u> |
|----------------|---------------------------|-----------------------|
| GERMANY | 100 39 044.7 | AUGUST 10, 2000 |

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ is submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



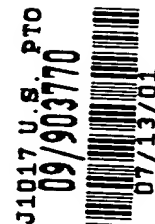
Norman F. Oblon
Registration No. 24,618

Daniel J. Pereira, Ph.D.
Registration No. 45,518



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/98)





Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 39 044.7

Anmeldetag: 10. August 2000

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE

Erstanmelder: Degussa-Hüls Aktiengesellschaft,
Frankfurt am Main/DE

Bezeichnung: Neue für das lysR1-Gen kodierende
Nukleotidsequenzen

IPC: C 07 H, C 12 P, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 07. Juni 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Neue für das lysR1-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das lysR1-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, durch Abschwächung des lysR1-Gens. Das lysR1-Gen kodiert für das LysR1-Protein, welches ein Transkriptionsregulator der LysR-Familie ist.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und die Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure-produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt.

5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- 10 Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das lysR1-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
- 15 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 20 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz 25 von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Transkriptionsregulators LysR1 aufweist.

- Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine 30 replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No.1 oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- 5 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i):

Weitere Gegenstände sind:

- 10 eine replizierbare DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID No.1 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

- 15 ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid, Punkt d, insbesondere pCR2.1lysRlint, hinterlegt in E.coli DSM 13616 bei der DSMZ, Braunschweig (Deutschland);

und coryneforme Bakterien, die in dem lysR1-Gen eine

- 20 Insertion oder Deletion, insbesondere unter Verwendung des Vektors pCR2.1lysRlint, enthalten.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung

- 25 einer entsprechenden Genbank, die das vollständige Gen mit der Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID No. 1 enthält mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten Polynukleotids gemäß SEQ ID No. 1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind als Hybridisierungssonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für das LysR1-Protein
5 kodieren oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des lysR1-Gens aufweisen.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-
10 Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für das LysR1-Protein kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende
15 Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf
20 Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene
25 Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität des LysR1-Proteins und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und
30 besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen
5 die für das lysR1-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet oder auf niedrigem Niveau exprimiert werden.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der
10 intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer
15 niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Aminosäuren, insbesondere L-Lysin
20 aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art
25 Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung Corynebacterium, insbesondere der Art Corynebacterium glutamicum (C. glutamicum), sind
30 besonders die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870

Corynebacterium melassecola ATCC17965

Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Brevibacterium flavum ATCC14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

- 5 oder daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende
Mutanten beziehungsweise Stämme, wie beispielsweise die L-
Lysin produzierenden Stämme

- Corynebacterium glutamicum* FERM-P 1709
Brevibacterium flavum FERM-P 1708
10 *Brevibacterium lactofermentum* FERM-P 1712
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464
Corynebacterium glutamicum DM58-1
Corynebacterium glutamicum DG52-5
15 *Corynebacterium glutamicum* DSM 5714 und
Corynebacterium glutamicum DSM 12866

Den Erfindern gelang es, das neue, für das *lysR1*-Protein
kodierende *lysR1*-Gen von *C. glutamicum*, welches ein
Transkriptionsregulator der *LysR*-Familie ist, zu isolieren.

- 20 Zur Isolierung des *lysR1*-Gens oder auch anderer Gene von *C.*
glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses
Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das
Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten
Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel
25 seien das Lehrbuch von Winnacker: *Gene und Klone*, Eine
Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim,
Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.:
Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor
Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank
30 ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et
al. (*Cell* 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde.
Bathe et al. (*Molecular and General Genetics*, 252:255-265,
1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032,
die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al.,

1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde. Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326

- 5 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032 unter Verwendung des Cosmides pH79 (Hohn und Collins, 1980, Gene 11, 291-298).

- Zur Herstellung einer Genbank von C. glutamicum in E. coli können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, 1979, Life Sciences, 25, 807-818) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche E. coli-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind wie beispielsweise der Stamm DH5 α (Jeffrey H. Miller: „A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria“, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1992).
- 10
- 15

- Die mit Hilfe von Cosmiden oder anderen λ -Vektoren klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige für die DNA-Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert werden.
- 20

- Methoden zur DNA-Sequenzierung sind unter anderem bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA, 74:5463-5467, 1977) beschrieben.
- 25

- Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.
- 30

Auf diese Weise wurde die neue für das lysR1-Gen kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum erhalten, die als SEQ ID No.

1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die
5 sich ergebende Aminosäuresequenz des lysR1-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind
10 DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als
15 „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar
20 stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology
25 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung,
30 die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels
35 Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im

Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Bei der Arbeit an der vorliegenden Erfindung konnte festgestellt werden, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des *lysR1*-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, produzieren.

- 15 Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die Expression des *lysR1*-Gens oder die katalytischen Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt oder ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.
- 20 Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z.B. in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), bei Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)), Vasicova et al. (Journal of Bacteriology 181: 6188 (1999)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers
- 35 („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag,

Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

5 Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der
katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind
aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die
Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological
Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al.
(Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762
10 (1997)) und Möckel („Die Threonindehydratase aus
Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen
Regulation und Struktur des Enzyms“, Berichte des
Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich,
Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen
15 können bekannten Lehrbüchern der Genetik und
Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine
Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen
werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen,
20 Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von
der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die
Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen (missense
mutations) oder Nichtsinnmutationen (nonsense mutations)
gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens
25 einem Basenpaar (bp) in einem Gen führen zu
Rasterverschiebungsmutationen (frame shift mutations), in
deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die
Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren
Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen
30 Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung
derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und
können bekannten Lehrbüchern der Genetik und
Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers
(„Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag,
35 Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und

Klone", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

5 Eine gebräuchliche Methode, Gene von *C. glutamicum* zu mutieren, ist die von Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)) beschriebene Methode der Gen-Unterbrechung (gene disruption) und des Gen-Austauschs (gene replacement).

10 Bei der Methode der Gen-Unterbrechung wird ein zentraler Teil der Kodierregion des interessierenden Gens in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob
15 (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB oder pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt
20 (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zentrale Teil der Kodierregion des Gens enthält, wird
25 anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind
30 beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross-over"-
35 Ereignisses wird die Kodierregion des betreffenden Gens

durch die Vektorsequenz unterbrochen und man erhält zwei unvollständige Allele, denen jeweils das 3'- bzw. das 5'-Ende fehlt. Diese Methode wurde beispielsweise von Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) zur Ausschaltung des recA-Gens von C. glutamicum verwendet.

In Figur 1 ist beispielhaft der Plasmidvektor pCR2.1 lysR1int gezeigt, mit Hilfe dessen das lysR1-Gen unterbrochen bzw. ausgeschaltet werden kann.

Bei der Methode des Genaustausches (gene replacement) wird eine Mutation wie z.B. eine Deletion, Insertion oder Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro hergestellt. Das hergestellte Allel wird wiederum in einen für C. glutamicum nicht replikativen Vektor kloniert und dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation in den gewünschten Wirt von C. glutamicum überführt. Nach homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden "cross-over"-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Exzision bewirkenden "cross-over"-Ereignisses im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde beispielsweise von Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)) verwendet, um das pyc-Gen von C. glutamicum durch eine Deletion auszuschalten.

In das lysR1-Gen kann auf diese Weise eine Deletion, Insertion oder ein Basenaustausch eingebaut werden.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des lysR1-Gens eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Pentosephosphat-Zyklus oder des Aminosäure-Exports zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Lysin gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 • das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
- das für die Enolase kodierende Gen eno (DE: 19947791.4),
- das für das zwf-Genprodukt kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- 10 • das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998))
- das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE (DE-A-195 48 222)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

- 15 Außerdem kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des lysR1-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 20 • das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1, DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478, DSM 12969),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE:1995 1975.7, DSM 13114)

- 25 abzuschwächen.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des lysR1-Gens unerwünschte Nebenreaktionen

auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms“, in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

- 5 Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren)
- 10 zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart,
- 15 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

- Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen
- 20 von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“, der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose,
- 25 Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette, wie zum Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie zum Beispiel Glycerin und Ethanol und organische Säuren, wie zum
- 30 Beispiel Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff
- 35 oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat,

Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure,
5 Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie zum Beispiel Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind.
10 Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen
15 Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak beziehungsweise Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie
20 Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende
25 Stoffe, wie zum Beispiel Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff- haltige Gasmischungen, wie zum Beispiel Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei
30 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem
35 Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so

wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei
5 Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Folgender Mikroorganismus wurde bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt:

- 10 • Escherichia coli Stamm E.coli TOP10F/pCR2.1lysRlint als DSM 13616.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von
15 Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring
20 Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al.
25 entnommen werden.

Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus C. glutamicum ATCC 13032

Chromosomale DNA aus C. glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei
30 Tauch et al., (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben, isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham

- Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland,
- 5 Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987), Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma
- 10 Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.
- 15 Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-
- 20 DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing
- 25 Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.
- Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Res. 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der
- 30 Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C
- 35 wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des Gens lysR1

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 μ g/ml Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden,

Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academies of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic
5 Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem
10 "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter
15 Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurden mit dem Programm XNIP (Staden,
20 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt. Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:33893402) gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI,
25 Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 912 Basenpaaren, welches als lysR1-Gen bezeichnet wurde. Das lysR1-Gen kodiert für ein
30 Polypeptid von 304 Aminosäuren.

Beispiel 3

Herstellung eines Integrationsvektors für die Integrationsmutagenese des lysR1-Gens

Aus dem Stamm ATCC 13032 wurde nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) chromosomale DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für *C. glutamicum* bekannten Sequenz des lysR1-Gens wurden die
5 folgenden Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion ausgewählt:

lysR1intA:

5`TTC CAA TCC CTG CTG TTC AC 3`

lysR1intB:

10 5`GTG ACC TTT GAA ACC AGC GA 3`

Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press)
15 mit Pwo-Polymerase der Firma Boehringer die PCR Reaktion durchgeführt. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurde ein 383 bp großes internes Fragment des lysR1-Gens isoliert, welches in der SEQ ID No. 3 dargestellt ist.

Das amplifizierte DNA Fragment wurde mit dem TOPO TA Cloning Kit der Firma Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA; Katalog Nummer K4500-01) in den Vektor pCR2.1-TOPO (Mead et al. (1991) Bio/Technology 9:657-663) ligiert.
20

Anschließend wurde der *E. coli* Stamm TOP10F mit dem Ligationsansatz (Hanahan, In: DNA Cloning. A Practical Approach. Vol. I, IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA, 1985) transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989),
25 der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI und
30

anschließender Agarosegel-Elektrophorese (0,8%) überprüft.
Das Plasmid wurde pCR2.1lysRlint genannt.

Beispiel 4

5 Integrationsmutagenese des lysR1-Gens in dem Lysinproduzenten DSM 5715

Der in Beispiel 3 genannte Vektor pCR2.1lysRlint wurde nach
der Elektroporationsmethode von Tauch et.al. (FEMS
Microbiological Letters, 123:343-347 (1994)) in
Corynebacterium glutamicum DSM 5715 elektroporiert. Bei dem
10 Stamm DSM 5715 handelt es sich um einen AEC resistenten
Lysin-Produzenten. Der Vektor pCR2.1lysRlint kann in DSM
5715 nicht selbständig replizieren und bleibt nur dann in
der Zelle erhalten, wenn er ins Chromosom von DSM 5715
integriert hat. Die Selektion von Klonen mit ins Chromosom
15 integriertem pCR2.1lysRlint erfolgte durch Ausplattieren
des Elektroporationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al.,
Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed. Cold Spring
Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), der mit
15 mg/l Kanamycin supplementiert worden war.

20 Für den Nachweis der Integration wurde das lysRlint-
Fragment nach der Methode "The DIG System Users Guide for
Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH
(Mannheim, Deutschland, 1993) mit dem Dig-
Hybridisierungskit der Firma Boehringer markiert.
25 Chromosomale DNA eines potentiellen Integranten wurde nach
der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 -
1828 (1994)) isoliert und jeweils mit den
Restriktionsenzymen SalI, SacI und HindIII geschnitten. Die
entstehenden Fragmente wurden mit Agarosegel-Elektrophorese
30 aufgetrennt und mit dem Dig-Hybrisierungskit der Firma
Boehringer bei 68°C hybridisiert. Das in Beispiel 3
genannte Plasmid pCR2.1lysRlint hatte innerhalb des
chromosomalen lysR1-Gens ins Chromosom von DSM 5715

inseriert. Der Stamm wurde als DSM 5715::pCR2.1lysRlint bezeichnet.

Beispiel 5

Herstellung von Lysin

- 5 Der in Beispiel 4 erhaltene *C. glutamicum* Stamm DSM 5715::pCR2.1lysRlint wurde in einem zur Produktion von Lysin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Lysingehalt im Kulturüberstand bestimmt.

- 10 Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz Agar mit Kanamycin (25 mg/l) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet.

15 Medium Cg III

NaCl 2,5 g/l

Bacto-Pepton 10 g/l

Bacto-Yeast-Extrakt 10 g/l

Glucose (getrennt autoklaviert) 2% (w/v)

Der pH-Wert wurde auf pH 7.4 eingestellt

- 20 Diesem wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 24 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkultur 0,1 OD betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM verwendet

Medium MM

| | |
|---|----------|
| CSL (Corn Steep Liquor) | 5 g/l |
| MOPS | 20 g/l |
| Glucose (getrennt autoklaviert) | 50g/l |
| Salze: | |
| (NH ₄) ₂ SO ₄) | 25 g/l |
| KH ₂ PO ₄ | 0,1 g/l |
| MgSO ₄ * 7 H ₂ O | 1,0 g/l |
| CaCl ₂ * 2 H ₂ O | 10 mg/l |
| FeSO ₄ * 7 H ₂ O | 10 mg/l |
| MnSO ₄ * H ₂ O | 5,0mg/l |
| Biotin (sterilfiltriert) | 0,3 mg/l |
| Thiamin * HCl (sterilfiltriert) | 0,2 mg/l |
| Leucin (sterilfiltriert) | 0,1 g/l |
| CaCO ₃ | 25 g/l |

CSL, MOPS und die Salzlösung werden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend werden die sterilen Substrat- und Vitaminlösungen sowie das trocken autoklavierte CaCO₃ zugesetzt.

- 5 Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 80% Luftfeuchtigkeit.

- 10 Nach 72 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete Lysinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik

(Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustausch-Chromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

5

Tabelle 1

| Stamm | OD(660) | Lysin-HCl g/l |
|--------------------------|---------|------------------|
| DSM 5715 | 7,5 | 13,01 |
| DSM 5715::pCR2.1lysR1int | 7,7 | 15,64 |

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG

5 <120> Neue für das lysR1-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 000172 BT

<140>

10 <141>

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 1311

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

20

<220>

<221> CDS

<222> (201)..(1109)

<223> lysR1-Gen

25

<400> 1

acagcccagg ggccgttgag ggggaaaagc tgcgttccaa tggcagcacc aaattgcagg 60

gatagggcgg aacccatcac catcaacact gcagcggact gtttattcat gcccttgatt 120

30

attgccaaag aaacctttaa' ggactagatc gaaaaacagc caactatagt taagtaatac 180

tgaacaattt tggaggtgtc gtg ctc aat ctc aac cgc tta cac atc ctg cag 233

35

Met Leu Asn Leu Asn Arg Leu His Ile Leu Gln

1

5

10

gaa ttc cac cgc ctg gga acg att aca gca gtg gcg gaa tcc atg aac 281

Glu Phe His Arg Leu Gly Thr Ile Thr Ala Val Ala Glu Ser Met Asn

15

20

25

40

tac agc cgc tct gcc atc tcc caa caa atg gcg ctg ctg gaa aaa gaa 329

Tyr Ser Arg Ser Ala Ile Ser Gln Gln Met Ala Leu Leu Glu Lys Glu

30

35

40

45

att ggt gtg aaa ctc ttt gaa aaa agc ggc cga aac ctc tac ttc aca 377

Ile Gly Val Lys Leu Phe Glu Lys Ser Gly Arg Asn Leu Tyr Phe Thr

45

50

55

50

gaa caa ggc gaa gtg ttg gcc tca gaa aca cat gcg atc atg gca gca 425

Glu Gln Gly Glu Val Leu Ala Ser Glu Thr His Ala Ile Met Ala Ala

60

65

70

75

55

gtc gac cat gcc cgc gca gcc gtt cta gat tcg ctg tct gaa gtg tcc 473

Val Asp His Ala Arg Ala Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Val Ser

80

85

90

gga acg ctg aaa gtc acc tcc ttc caa tcc ctg ctg ttc acc ctt gcc 521

Gly Thr Leu Lys Val Thr Ser Phe Gln Ser Leu Leu Phe Thr Leu Ala

95

100

105

ccg aaa gcc atc gcg cgc ctg acc gag aaa tac cca cac ctg caa gta 569
 Pro Lys Ala Ile Ala Arg Leu Thr Glu Lys Tyr Pro His Leu Gln Val
 110 115 120

5

gaa atc tcc caa cta gaa gtc acc gca gcg ctc gaa gaa ctc cgc gcc 617
 Glu Ile Ser Gln Leu Glu Val Thr Ala Ala Leu Glu Glu Leu Arg Ala
 125 130 135

10

cgc cgc gtc gac gtc gca ctc ggc gag gaa tac ccc gtg gaa gtc ccc 665
 Arg Arg Val Asp Val Ala Leu Gly Glu Glu Tyr Pro Val Glu Val Pro
 140 145 150 155

15

ctt gtt gag gcc agc att cac cgc gaa gtc ctc ttc gaa gac ccc atg 713
 Leu Val Glu Ala Ser Ile His Arg Glu Val Leu Phe Glu Asp Pro Met
 160 165 170

20

ctg ctc gtc acc cca gca agc ggc cca tac tct ggc ctc acc ctg cca 761
 Leu Leu Val Thr Pro Ala Ser Gly Pro Tyr Ser Gly Leu Thr Leu Pro
 175 180 185

25

gaa ctc cgc gac atc ccc atc gcc atc gat cca ccc gac ctt ccc gcg 809
 Glu Leu Arg Asp Ile Pro Ile Ala Ile Asp Pro Pro Asp Leu Pro Ala
 190 195 200

30

ggc gaa tgg gtc cat agg ctc tgc cgg cgc gcc ggg ttt gag ccc cgc 857
 Gly Glu Trp Val His Arg Leu Cys Arg Arg Ala Gly Phe Glu Pro Arg
 205 210 215

35

gtg acc ttt gaa acc agc gat ccc atg ctc caa gca cac ctc gtg cgt 905
 Val Thr Phe Glu Thr Ser Asp Pro Met Leu Gln Ala His Leu Val Arg
 220 225 230 235

40

agc ggc ttg gcc gtg aca ttt tcc ccc aca ctg ctc acc ccg atg ctg 953
 Ser Gly Leu Ala Val Thr Phe Ser Pro Thr Leu Leu Thr Pro Met Leu
 240 245 250

45

gaa agc gtg cac atc cag ccg ctg ccc ggc aac ccc acg cgc acg ctc 1001
 Glu Ser Val His Ile Gln Pro Leu Pro Gly Asn Pro Thr Arg Thr Leu
 255 260 265

50

tac acc gcg gtc agg gaa ggg cgc cag ggg cat cca gcc att aaa gct 1049
 Tyr Thr Ala Val Arg Glu Gly Arg Gln Gly His Pro Ala Ile Lys Ala
 270 275 280

55

ttt cga cga gcc ctc gcc cat gtg gcc aaa gaa tct tat ttg gag gct 1097
 Phe Arg Arg Ala Leu Ala His Val Ala Lys Glu Ser Tyr Leu Glu Ala
 285 290 295

cgt cta gta gag tgagttcttg tgagccttca gacaaatcat cgcccagtag 1149
 Arg Leu Val Glu
 300

tcgtcgttga cttcggcgca cagtacgcgc agctgatcgc acgtcgtgtg cgtgaggccg 1209

gcatctactc cgaagtcac cgcacaccg ccaccgcaga cgatgtgcgc gctaaaaatg 1269

cagcagccct cgtcctttcc ggtggcccat cctccgtgta tg 1311

<210> 2

<211> 303

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 10 | Met | Leu | Asn | Leu | Asn | Arg | Leu | His | Ile | Leu | Gln | Glu | Phe | His | Arg | Leu |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| | Gly | Thr | Ile | Thr | Ala | Val | Ala | Glu | Ser | Met | Asn | Tyr | Ser | Arg | Ser | Ala |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| 15 | Ile | Ser | Gln | Gln | Met | Ala | Leu | Leu | Glu | Lys | Glu | Ile | Gly | Val | Lys | Leu |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| | Phe | Glu | Lys | Ser | Gly | Arg | Asn | Leu | Tyr | Phe | Thr | Glu | Gln | Gly | Glu | Val |
| | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| 20 | Leu | Ala | Ser | Glu | Thr | His | Ala | Ile | Met | Ala | Ala | Val | Asp | His | Ala | Arg |
| | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| | Ala | Ala | Val | Leu | Asp | Ser | Leu | Ser | Glu | Val | Ser | Gly | Thr | Leu | Lys | Val |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| 25 | Thr | Ser | Phe | Gln | Ser | Leu | Leu | Phe | Thr | Leu | Ala | Pro | Lys | Ala | Ile | Ala |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| | Arg | Leu | Thr | Glu | Lys | Tyr | Pro | His | Leu | Gln | Val | Glu | Ile | Ser | Gln | Leu |
| 30 | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| | Glu | Val | Thr | Ala | Ala | Leu | Glu | Glu | Leu | Arg | Ala | Arg | Arg | Val | Asp | Val |
| | | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| 35 | Ala | Leu | Gly | Glu | Glu | Tyr | Pro | Val | Glu | Val | Pro | Leu | Val | Glu | Ala | Ser |
| | 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| | Ile | His | Arg | Glu | Val | Leu | Phe | Glu | Asp | Pro | Met | Leu | Leu | Val | Thr | Pro |
| | | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| 40 | Ala | Ser | Gly | Pro | Tyr | Ser | Gly | Leu | Thr | Leu | Pro | Glu | Leu | Arg | Asp | Ile |
| | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| | Pro | Ile | Ala | Ile | Asp | Pro | Pro | Asp | Leu | Pro | Ala | Gly | Glu | Trp | Val | His |
| 45 | | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| | Arg | Leu | Cys | Arg | Arg | Ala | Gly | Phe | Glu | Pro | Arg | Val | Thr | Phe | Glu | Thr |
| | | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| 50 | Ser | Asp | Pro | Met | Leu | Gln | Ala | His | Leu | Val | Arg | Ser | Gly | Leu | Ala | Val |
| | 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| | Thr | Phe | Ser | Pro | Thr | Leu | Leu | Thr | Pro | Met | Leu | Glu | Ser | Val | His | Ile |
| | | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| 55 | Gln | Pro | Leu | Pro | Gly | Asn | Pro | Thr | Arg | Thr | Leu | Tyr | Thr | Ala | Val | Arg |
| | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | |
| | Glu | Gly | Arg | Gln | Gly | His | Pro | Ala | Ile | Lys | Ala | Phe | Arg | Arg | Ala | Leu |

275 280 285

Ala His Val Ala Lys Glu Ser Tyr Leu Glu Ala Arg Leu Val Glu
290 295 300

5

<210> 3
<211> 383
10 <212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
15 <223> lysRlint-Fragment

<400> 3
ttccaatccc tgctgttcac ccttgccccg aaagccatcg cgcgcctgac cgagaaatac 60
ccacacctgc aagtagaaat ctcccaacta gaagtcaccg cagcgctcga agaactccgc 120
gcccgcgcgcg tcgacgtcgc actcggcgag gaataccccc tggaagtccc ccttggtgag 180
20 gccagcattc accgcgaagt cctcttcgaa gaccccatgc tgctcgtcac ccagcaagc 240
ggcccatact ctggcctcac cctgccagaa ctccgcgaca tccccatcgc catcgatcca 300
cccgaccttc ccgcgggcga atgggtccat aggtctctgcc ggcgcgccgg gtttgagccc 360
cgcgtgacct ttgaaaccag cga 383

25

Folgende Figuren sind beigelegt:

Figur 1: Karte des Plasmids pCR2.1lysRint.

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung.

| | |
|------------|---|
| KmR: | Kanamycin Resistenz-Gen |
| EcoRI: | Schnittstelle des Restriktionsenzym EcoRI |
| lysRint: | internes Fragment des lysR1-Gens |
| ColE1 ori: | Replikationsursprung des Plasmids ColE1 |

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das lysR1-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens zu 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
 - 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b), oder c),wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Transkriptionsregulators LysR1 aufweist.
- 20 2. Polynukleotide gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotide gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
- 25 4. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2 enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
 - (iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls
 - (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Coryneforme Bakterien, in denen das lysR1-Gen abgeschwächt, bevorzugt ausgeschaltet wird.
7. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man folgende Schritte durchführt,
- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Bakterien, in denen man zumindest das lysR1-Gen abschwächt,
 - b) Anreicherung des gewünschten Produkts im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
 - c) Isolieren der L-Aminosäure.
8. Verfahren gemäß Anspruch 7, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.
9. Verfahren gemäß Anspruch 7, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
10. Verfahren gemäß Anspruch 7, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man die Expression des (der) Polynukleotids(e), das (die) für das lysR1-

Gen kodiert (kodieren) verringert, insbesondere ausschaltet.

- 5 11. Verfahren gemäß Anspruch 7, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man die
regulatorischen Eigenschaften des Polypeptids
herabsetzt, für das das Polynukleotid lysR1 kodiert.
- 10 12. Verfahren gemäß Anspruch 7, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man für die
Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin,
Bakterien fermentiert, in denen man gleichzeitig eines
oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 12.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase
kodierende Gen dapA,
- 12.2 das für die Enolase kodierende Gen eno,
- 15 12.3 das für das zwf-Genprodukt kodierende Gen zwf,
- 12.4 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen
pyc,
- 12.5 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
verstärkt, bevorzugt überexprimiert.
- 20 13. Verfahren gemäß Anspruch 7, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man gleichzeitig
eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der
Gruppe:
- 25 13.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
kodierende Gen pck,
- 13.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase
kodierende Gen pgi,
- 13.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB
abschwächt.

14. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man Mikroorganismen der Art *C. glutamicum* einsetzt.
- 5 15. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für den Transkriptionsregulator LysR1 kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des lysR1-Gens aufweisen, d a d u r c h
10 g e k e n n z e i c h n e t, dass man die Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1 bis 4 als Hybridisierungssonden einsetzt.

Neue für das lysR1-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

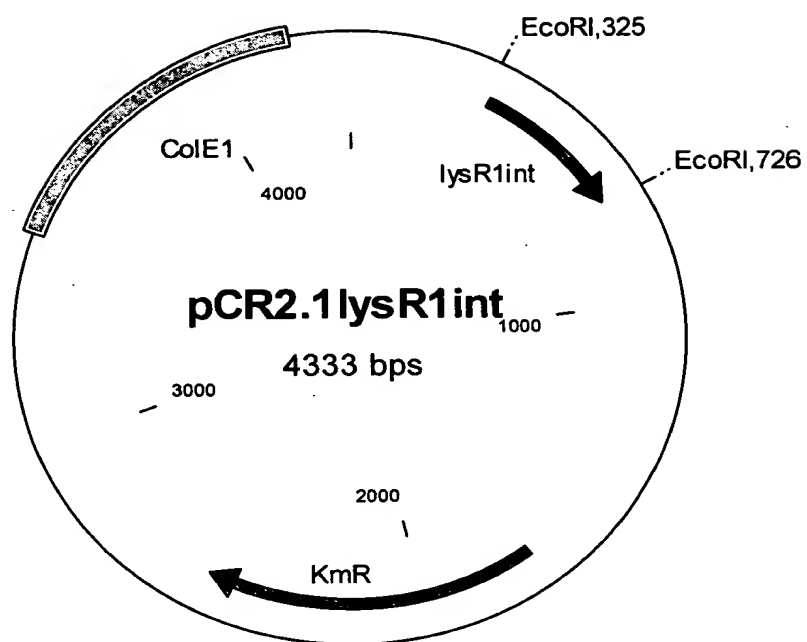
Zusammenfassung

Isoliertes Polynukleotid enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

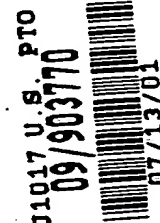
- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

20 und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das lysR1-Gen abgeschwächt vorliegt, und die Verwendung der Polynukleotidsequenzen als Hybridisierungssonden.

Figur 1: Plasmidkarte von pCR2.1lysR1int



TRANSLATOR'S DECLARATION



I, John F. Moloney, BSc., MIL., CChem., MRSC., translator to Taylor & Meyer of 20 Kingsmead Road, London, SW2 3JD, Great Britain, verify that I know well both the German and the English language, that I have prepared the attached English translation of pages of a German Patent application in the German language with the title:

Neue für das lysR1-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

identified by the code number 000179 BT / AL at the upper left of each page and that the attached English translation of this document is a true and correct translation of the document attached thereto to the best of my knowledge and belief.

I further declare that all statements made of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true, and further that these statements are made with the knowledge that wilful false statements and the like are punishable by fine or imprisonment, or both, under 18 USC 1001, and that such false statements may jeopardize the validity of this document.

By: J. F. Moloney

Date: 19th March 2001

New Nucleotide Sequences Coding for the lysR1 Gene

The invention provides nucleotide sequences from coryneform bacteria coding for the lysR1 gene and a process for the enzymatic production of amino acids, in particular L-lysine, by attenuation of the lysR1 gene. The lysR1 gene codes for lysR1 protein, which is a transcription regulator of the lysR family.

Prior Art

L-amino acids, in particular L-lysine, are used in human medicine and in the pharmaceutical industry, in the foodstuffs industry, and most particularly in animal nutrition.

It is known that amino acids can be produced by fermentation of strains of coryneform bacteria, in particular *Corynebacterium glutamicum*. On account of the great importance of these amino acids constant efforts are being made to improve the production processes. Improvements in production processes may involve fermentation technology measures, such as for example stirring and provision of oxygen, or the composition of the nutrient media, such as for example the sugar concentration during the fermentation, or the working up to the product form by for example ion exchange chromatography, or the intrinsic performance properties of the microorganism itself.

Methods involving mutagenesis, selection and mutant selection are used to improve the performance properties of these microorganisms. In this way strains are obtained that are resistant to antimetabolites or are auxotrophic for regulatorily significant metabolites and that produce amino acids.

For some years recombinant DNA technology methods have also been used to improve strains of *Corynebacterium* that produce L-amino acids.

Object of the Invention

- 5 The inventors have set themselves the task of developing new procedures for the improved enzymatic production of amino acids, especially L-lysine.

Description of the Invention

10 The invention provides an isolated polynucleotide of coryneform bacteria containing a polynucleotide sequence coding for the *lysR1* gene, selected from the group comprising

- 15 a) polynucleotide that is at least 70% identical to a polynucleotide coding for a polypeptide that contains the amino acid sequence of SEQ ID No. 2,
- b) polynucleotide coding for a polypeptide that contains an amino acid sequence that is at least 70% identical to the amino acid sequence of SEQ ID No. 2,
- 20 c) polynucleotide that is complementary to the polynucleotides of a) or b), and
- d) polynucleotide containing at least 15 successive nucleotides of the polynucleotide sequence of a), b) or c),

25 the polypeptide preferably having the activity of the transcription regulator *lysR1*.

The invention also provides the aforementioned polynucleotide, which is preferably a replicable DNA containing:

- (i) the nucleotide sequence shown in SEQ ID No.1, or

- (ii) at least one sequence that corresponds to the sequence (i) within the region of degeneration of the genetic code, or
- (iii) at least one sequence that hybridises with the sequences that are complementary to the sequences (i) or (ii), and optionally
- (iv) functionally neutral sense mutations in (i).

The invention furthermore provides:

a replicable DNA containing the nucleotide sequence as
10 illustrated in SEQ ID No.1;

a polynucleotide coding for a polypeptide that contains the amino acid sequence as is illustrated in SEQ ID No. 2;

a vector containing the polynucleotide d) according to the invention, in particular pCR2.llysRlint inserted into
15 E. Coli DSM 13616 and filed at DSMZ, Brunswick, (Germany);

and coryneform bacteria that in the lysR1 gene contain an insertion or deletion, in particular by using the vector pCR2.llysRlint.

20 The invention thus provides polynucleotides consisting substantially of a polynucleotide sequence, that are obtainable by screening by hybridising a corresponding gene library that contains the complete gene with the polynucleotide sequence corresponding to SEQ ID No.1, with
25 a probe that contains the sequence of the aforementioned polynucleotide according to SEQ ID No. 1 or a fragment thereof, and isolating the aforementioned DNA sequence.

Polynucleotide sequences according to the invention are suitable as hybridisation probes for RNA, cDNA and DNA, in
30 order to isolate nucleic acids, polynucleotides or genes in their full length that code for lysR1 protein, or to

isolate such nucleic acids or polynucleotides or genes that have a high degree of similarity to the sequence of the lysR1 gene.

5 Polynucleotide sequences according to the invention are furthermore suitable as primers with the aid of which and by means of the polymerase chain reaction (PCR), DNA of genes can be produced that code for lysR1 protein.

10 Such oligonucleotides serving as probes or primers contain at least 30, preferably at least 20, and most particularly preferably at least 15 successive nucleotides. Also suitable are oligonucleotides having a length of at least 40 or 50 nucleotides.

"Isolated" denotes separated from its natural environment.

15 "Polynucleotide" refers in general to polyribonucleotides and polydeoxyribonucleotides, which may either be unmodified RNA or DNA or modified RNA or DNA.

The term "polypeptides" denotes peptides or proteins that contain two or more amino acids bound via peptide bonds.

20 The polypeptides according to the invention include a polypeptide according to SEQ ID No. 2, in particular those peptides having the biological activity of lysR1 protein, and also those polypeptides that are at least 70%, preferably at least 80% and particularly preferably at least 90% to 95% identical to the polypeptide according to
25 SEQ ID No. 2 and have the aforementioned activity.

30 The present invention furthermore relates to a process for the enzymatic production of amino acids, in particular L-lysine, using coryneform bacteria that in particular already produce amino acids and in which the nucleotide sequences coding for the lysR1 gene are attenuated, in particular are switched off or are expressed at a low level.

- The term "attenuation" used in this context denotes the reduction or switching off of the intracellular activity of one or more enzymes (proteins) in a microorganism that are coded by the corresponding DNA, by for example using a weak promoter or using a gene or allele that codes for a corresponding gene having a low activity or that inactivates the corresponding gene or enzyme (protein), and optionally combining these measures.
- 10 The microorganisms that are the subject of the present invention may produce amino acids, in particular L-lysine, from glucose, sucrose, lactose, fructose, maltose, molasses, starch, cellulose or from glycerol and ethanol. These microorganisms may be representatives of coryneform
- 15 bacteria, in particular of the genus *Corynebacterium*. In the genus *Corynebacterium* the species *Corynebacterium glutamicum* should in particular be mentioned, which is known to those skilled in the art for its ability to produce L-amino acids.
- 20 Suitable strains of the genus *Corynebacterium*, in particular of the species *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), are in particular the known wild type strains
- Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
- 25 *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870
Corynebacterium melassecola ATCC17965
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Brevibacterium flavum ATCC14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 and
- 30 *Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

or mutants or strains formed therefrom that produce L-amino acids, such as for example the strains producing L-lysine.

Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709
Brevibacterium flavum FERM-P 1708
Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463
5 Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464
Corynebacterium glutamicum DM58-1
Corynebacterium glutamicum DG52-5
Corynebacterium glutamicum DSM 5714 and
Corynebacterium glutamicum DSM 12866

- 10 The inventors have successfully isolated the new *lysR1* gene from *C. glutamicum* coding for *lysR1* protein, which is a transcription regulator of the *lysR* family.

In order to isolate the *lysR1* gene or also other genes from *C. glutamicum*, a gene library of this microorganism is
15 first of all introduced into *Escherichia coli* (*E. coli*). The introduction of gene libraries is described in generally known textbooks and manuals. As an example there may be mentioned the textbook by Winnacker: *Gene and Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie* (Verlag Chemie,
20 Weinheim, Germany, 1990), or the manual by Sambrook et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). A very well-known gene library is that of the *E. coli* K-12 strain W3110, which was introduced by Kohara et al. (*Cell* 50, 495-508 (1987)) into λ -vectors.
25 Bathe et al. (*Molecular and General Genetics*, 252:255-265, 1996) describe a gene library of *C. glutamicum* ATCC13032, which was introduced by means of the cosmid vector SuperCos I (Wahl et al., 1987, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 84:2160-2164) in the *E. coli* K-12 strain
30 NM554 (Raleigh et al., 1988, *Nucleic Acids Research* 16:1563-1575). Börmann et al. (*Molecular Microbiology* 6(3), 317-326 (1992)) again describe a gene library of *C. glutamicum* ATCC13032 using the cosmid pH79 (Hohn and Collins, 1980, *Gene* 11, 291-298).

In order to produce a gene library of *C. glutamicum* in *E. coli* there may also be used plasmids such as pBR322 (Bolivar, 1979, Life Sciences, 25, 807-818) or pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268). Suitable hosts are in particular those *E. coli* strains that are restriction and recombinant defective, such as for example the strain DH5 α , (Jeffrey H. Miller: "A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)

The long DNA fragments cloned with the help of cosmids or other λ -vectors may then in turn be subcloned into conventional vectors suitable for DNA sequencing.

Methods of DNA sequencing are described in, *inter alia*, Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA, 74:5463-5467, 1977).

The DNA sequences obtained may then be investigated with known algorithms or sequence analysis programs, such as for example that of Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), that of Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) or the GCG program of Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)).

The new DNA sequence of *C. glutamicum* coding for the *lysR1* gene was obtained in this way, and as SEQ ID No. 1 is part of the present invention. The amino acid sequence of the corresponding protein was also derived from the existing DNA sequence using the aforescribed methods. The resulting amino acid sequence of the *lysR1* gene product is shown in SEQ ID No. 2.

Coding DNA sequences that are obtained from SEQ ID No. 1 as a result of the degenerability of the genetic code are also covered by the invention. Similarly, DNA sequences that

hybridise with SEQ ID No. 1 or parts of SEQ ID No. 1 are also covered by the invention. Furthermore, in this specialist field conservative amino acid replacements, such as for example the replacement of glycine by alanine or of aspartic acid by glutamic acid in proteins, are known as sense mutations, which do not lead to any fundamental change in the activity of the protein, i.e. are functionally neutral. Furthermore, it is known that changes at the N-terminus and/or C-terminus of a protein do not significantly impair or may even stabilise its function. Those skilled in the art can find details of this in, *inter alia*, Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), in O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), in Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), in Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) and in known textbooks of genetics and molecular biology. Amino acid sequences that are obtained in a corresponding manner from SEQ ID No. 2 are likewise covered by the invention.

Finally, DNA sequences that are produced by the polymerase chain reaction (PCR) using primers resulting from SEQ ID No. 1, are also covered by the invention. Such oligonucleotides typically have a length of at least 15 nucleotides.

The person skilled in the art can find details of the identification of DNA sequences by means of hybridisation in, *inter alia*, the textbook "The DIG System User's Guide for Filter Hybridization" published by Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Germany, 1993) and in Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). The person skilled in the art can obtain details of the amplification of DNA sequences by means of the polymerase chain reaction (PCR) in, *inter alia*, the handbook by Gait: Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) and the Newton and

Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Germany, 1994).

In the course of work carried out on the present invention it was found that coryneform bacteria after attenuation of the lysR1 gene produce amino acids, in particular L-lysine,
5 in an improved manner.

In order to achieve an attenuation, either the expression of the lysR1 gene or the catalytic properties of the enzyme protein may be reduced or switched off. Optionally both
10 measures may be combined.

The reduction of the gene expression may be achieved by suitable culture conditions or by genetic alteration (mutation) of the signal structures of the gene expression. Signal structures of the gene expression are for example
15 repressor genes, activator genes, operators, promoters, attenuators, ribosome binding sites, the start codon and terminators. The person skilled in the art can obtain further information on this in for example patent application WO 96/15246, in Boyd and Murphy (Journal of
20 Bacteriology 170: 5949 (1988)), in Voskuil and Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), in Jensen and Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), in Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)), Vasicova et al. (Journal of Bacteriology 181: 6188 (1999)) and in
25 known textbooks of genetics and molecular biology, such as for example the textbook by Knippers ("Molekulare Genetik", 6th Edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, 1995) or the textbook by Winnacker ("Gene and Klone", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, 1990).

30 Mutations that lead to an alteration or reduction of the catalytic properties of enzyme proteins are known in the prior art; as examples there may be mentioned the work of Qiu and Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and

- Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) and Möckel ("Die Threonindehydratase aus *Corynebacterium glutamicum*: Aufhebung der allosterischen Regulation and Struktur des Enzyms", and reports published by the Jülich Research Centre, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Germany, 1994).
- 5 Overviews may be obtained from known textbooks on genetics and molecular biology, for example that of Hagemann ("Allgemeine Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986).
- 10 Mutations in the present context include transitions, transversions, insertions and deletions. Depending on the effect of the amino acid replacement on the enzyme activity, one talks either of missense mutations or nonsense mutations. Insertions or deletions of at least
- 15 one base pair (bp) in a gene lead to frame shift mutations, following which false amino acids are incorporated or the translation terminates prematurely. Deletions of several codons typically lead to a complete cessation of enzyme activity. Details of the production of such mutations are
- 20 part of the prior art and may be obtained from known textbooks on genetics and molecular biology, such as for example the textbook by Knippers ("Molekulare Genetik", 6th Edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, 1995), the textbook by Winnacker ("Gene and Klone", VCH
- 25 Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, 1990) or the textbook by Hagemann ("Allgemeine Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986).

A conventional method of mutating genes of *C. glutamicum* is the method of gene disruption and gene replacement

30 described by Schwarzer and Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)).

In the method of gene disruption a central part of the coding region of the gene in question is cloned into a plasmid vector that can replicate in a host (typically *E. coli*), but not in *C. glutamicum*. Suitable vectors are for

35

example pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob or pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB or pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega Corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994), Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt (Invitrogen, Groningen, Netherlands; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) or pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516). The plasmid vector that contains the central part of the coding region of the gene is then converted by conjugation or transformation into the desired strain of *C. glutamicum*. The method of conjugation is described for example by Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)). Methods of transformation are described for example in Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican and Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) and Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)). After homologous recombination by means of a cross-over event, the coding region of the relevant gene is disrupted by the vector sequence and two incomplete alleles are obtained, missing respectively the 3'- and 5'-end. This method has been used for example by Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) to switch off the *recA* gene of *C. glutamicum*.

Fig. 1 shows for example the plasmid vector pCR2.1 *lysR*int, by means of which the *lysR* gene can be disrupted or switched off.

In the gene replacement method a mutation, such as for example a deletion, insertion or base replacement, is produced *in vitro* in the gene that is of interest. The resultant allele is in turn cloned into a non-replicative vector for *C. glutamicum*, and this is then converted by

transformation or conjugation into the desired host of *C. glutamicum*. After homologous recombination by means of a first cross-over event effecting integration, and an appropriate second cross-over event effecting an excision,
5 the incorporation of the mutation or allele in the target gene or in the target sequence is achieved. This method has been used for example by Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)) to switch off the *pyc* gene of *C. glutamicum* by a deletion.

10 A deletion, insertion or a base replacement can be incorporated into the *lysR1* gene in this way.

In addition, it may be advantageous for the production of L-amino acids, in particular L-lysine, in addition to the attenuation of the *lysR1* gene, also to enhance, in
15 particular overexpress, one or more enzymes of the respective biosynthesis pathway, glycolysis, anapleurosis, pentose phosphate cycle, or amino acid export.

Thus for example, for the production of L-lysine one or more of the genes selected from the following group may
20 simultaneously be enhanced, in particular overexpressed

- the gene *dapA* coding for dihydrodipicolinate synthase (EP-B 0 197 335),
- the gene *eno* coding for enolase (DE: 19947791.4),
- the gene *zwf* coding for the *zwf* gene product (JP-A-
25 09224661),
- the gene *pyc* coding for pyruvate carboxylase (Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998))
- the gene *lysE* coding for lysine export (DE-A-195 48 222).

Also, it may be advantageous for the production of amino acids, especially L-lysine, besides attenuating the *lysR1* gene, at the same time to attenuate one or more of the genes selected from the group

- 5 • the gene *pck* coding for phosphoenol pyruvate carboxykinase (DE 199 50 409.1, DSM 13047),
- the gene *pgi* coding for glucose-6-phosphate isomerase (US 09/396,478, DSM 12969),
- the gene *poxB* coding for pyruvate oxidase
- 10 (DE:1995 1975.7, DSM 13114)

Moreover, it may be advantageous for the production of amino acids, in particular L-lysine, in addition to attenuating the *lysR1* gene also to switch off undesirable secondary reactions (Nakayama: "Breeding of Amino Acid

15 Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

The microorganisms produced according to the invention are likewise covered by the invention and for the purposes of

20 producing L-amino acids, in particular L-lysine, may be cultivated continuously or batchwise in a batch process, or in a feed batch process or repeated batch process. A summary of known cultivation methods is described in the textbook by Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die

25 Bioverfahrens-technik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) or in the textbook by Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Brunswick/Wiesbaden, 1994)).

The culture medium to be used must satisfy in an

30 appropriate manner the requirements of the respective strains. Descriptions of culture media for various microorganisms are given in the handbook "Manual of Methods for General Bacteriology" of the American Society for

Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981). As carbon source there may be used sugars and carbohydrates such as for example glucose, sucrose, lactose, fructose, maltose, molasses, starch and cellulose, oils and fats such as for example soya oil, sunflower oil, groundnut oil and coconut oil, fatty acids such as for example palmitic acid, stearic acid and linoleic acid, alcohols such as for example glycerol and ethanol, and organic acids such as for example acetic acid. These substances may be used individually or as a mixture.

As nitrogen source there may be used organic nitrogen-containing compounds such as peptones, yeast extract, meat extract, malt extract, corn steep liquor, soya bean flour and urea, or inorganic compounds such as ammonium sulfate, ammonium chloride, ammonium phosphate, ammonium carbonate and ammonium nitrate. The nitrogen sources may be used individually or as a mixture.

As phosphorus source there may be used phosphoric acid, potassium dihydrogen phosphate or dipotassium hydrogen phosphate, or the corresponding sodium-containing salts. The culture medium must furthermore contain salts of metals, such as for example magnesium sulfate or iron sulfate, that are necessary for growth. Finally, essential growth promoters such as amino acids and vitamins may in addition be added to the aforementioned substances. Suitable precursors may moreover be added to the culture medium. The aforementioned starting substances may be added to the culture in the form of a single batch, or metered in in an appropriate manner during the cultivation procedure.

In order to control the pH of the culture basic compounds such as sodium hydroxide, potassium hydroxide, ammonia or ammonia water, or acidic compounds such as phosphoric acid or sulfuric acid may be added in an appropriate manner. In order to control foam formation anti-foaming agents such as

for example fatty acid polyglycol esters may be used. In order to maintain the stability of plasmids selectively acting substances, such as for example antibiotics, may be added to the medium. In order to maintain aerobic
5 conditions, oxygen or oxygen-containing gas mixtures, such as for example air, are pumped into the culture. The temperature of the culture is normally 20°C to 45°C and preferably 25°C to 40°C. The cultivation is continued until a maximum amount of the desired product has been
10 formed. This target is normally reached within 10 hours to 160 hours.

Methods for determining L-amino acids are known from the prior art. The analysis may for example be carried out as described by Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30,
15 (1958), 1190) by anion exchange chromatography followed by ninhydrin derivatisation, or it may be carried out by reversed phase HPLC, as described by Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174).

The following microorganism has been filed according to the
20 Budapest Convention at the German Collection for Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Brunswick, Germany).

- Escherichia coli strain E. coli TOP10F/pCR2.1lysR_{int} as DSM 13616.

25 The process according to the invention serves for the enzymatic production of amino acids, in particular L-lysine.

The present invention is illustrated in more detail hereinafter with the aid of examples of implementation.

30 The isolation of plasmid DNA from Escherichia coli as well as all techniques for the restriction, Klenow and alkaline phosphatase treatment were carried out according to Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual,

1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA). Methods for the transformation of *Escherichia coli* are likewise described in this handbook.

5 The compositions of conventional nutrient media such as LB medium or TY medium may also be obtained from the handbook by Sambrook et al.

Example 1

Production of a genomic cosmid gene library from *C. glutamicum* ATCC 13032

- 10 Chromosomal DNA from *C. glutamicum* ATCC 13032 was isolated as described by Tauch et al., (1995, Plasmid 33:168-179) and partially cleaved with the restriction enzyme *Sau3AI* (Amersham Pharmacia, Freiburg, Germany, Product Description *Sau3AI*, Code no. 27-0913-02). The DNA fragments were
- 15 dephosphorylated with shrimp alkaline phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany, Product Description SAP, Code no. 1758250). The DNA of the cosmid vector SuperCos1 (Wahl et al. (1987), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 84:2160-2164), obtained
- 20 from Stratagene (La Jolla, USA, Product Description SuperCos1 Cosmid Vector Kit, Code no. 251301) was cleaved with the restriction enzyme *XbaI* (Amersham Pharmacia, Freiburg, Germany, Product Description *XbaI*, Code no. 27-0948-02) and likewise dephosphorylated with shrimp alkaline
- 25 phosphatase.

- The cosmid DNA was then cleaved with the restriction enzyme *BamHI* (Amersham Pharmacia, Freiburg, Germany, Product Description *BamHI*, Code no. 27-0868-04). The cosmid DNA treated in this way was mixed with the treated ATCC13032-
- 30 DNA, and the batch was then treated with T4-DNA ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Germany, Product Description T4-DNA ligase, Code no.27-0870-04). The ligation mixture was then packed into phages using Gigapack II XL Packing

Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Product Description Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217).

In order to infect the E. coli strain NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Res. 16:1563-1575) the cells were taken
5 up in 10 mM MgSO₄ and mixed with an aliquot of the phage
suspension. Infection and titration of the cosmid library
were carried out as described by Sambrook et al. (1989,
Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring
Harbor), the cells being plated out on LB agar (Lennox,
10 1955, Virology, 1:190) + 100 µg/ml ampicillin. After
incubation overnight at 37°C recombinant individual clones
were selected.

Example 2

Isolation and sequencing of the gene lysR1

15 The cosmid DNA of an individual colony was isolated with
the Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen,
Hilden, Germany) according to the manufacturer's
instructions and then partially cleaved with the
restriction enzyme Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg,
20 Germany, Product Description Sau3AI, Product No. 27-0913-
02). The DNA fragments were dephosphorylated with shrimp
alkaline phosphatase (Roche Molecular Biochemicals,
Mannheim, Germany, Product Description SAP, Product No.
1758250). After gel electrophoresis separation the cosmid
25 fragments were isolated in the size range from 1500 to 2000
bp using the QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021,
Qiagen, Hilden, Germany).

The DNA of the sequencing vector pZero-1 obtained from
Invitrogen (Groningen, Netherlands, Product Description
30 Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) was
cleaved with the restriction enzyme BamHI (Amersham
Pharmacia, Freiburg, Germany, Product Description BamHI,
Product No. 27-0868-04). The ligation of the cosmid

fragments into the sequencing vector pZero-1 was carried out as described by Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor), the DNA mixture having been incubated overnight with T4 ligase
5 (Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany). This ligation mixture was then electroporated into the E. coli strain DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 87:4645-4649) (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol. Letters, 123:343-7) and plated out onto LB-agar
10 (Lennox, 1955, Virology, 1:190) with 50 μ g/l zeocin.

The plasmid preparation of the recombinant clone was carried out with the Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Germany). The sequencing was performed according to the dideoxy chain termination method of Sanger
15 et al. (1977, Proceedings of the National Academies of Sciences, U.S.A., 74:5463-5467) as modified by Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). The "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" from PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Germany) was
20 used. The gel electrophoresis separation and analysis of the sequencing reaction were carried out in a "Rotiphoresis NF Acrylamide/Bisacrylamide" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) using the "ABI Prism 377" sequencing device from PE Applied Biosystems (Weiterstadt,
25 Germany).

The raw sequence data thus obtained were then processed using the Staden Program Package (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0. The individual sequences of the pZero1 derivatives were assembled to form a
30 coherent contig. The computer-assisted coding region analysis was prepared using the XNIP program (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231). Further analyses were carried out with the "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:33893402) against the

non-redundant database of the National Center for
Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA).

The nucleotide sequence thus obtained is represented in SEQ
ID No. 1. Analysis of the nucleotide sequence revealed an
5 open reading frame of 912 base pairs, which was termed the
lysR1 gene. The lysR1 gene codes for a polypeptide of 304
amino acids.

Example 3

10 Production of an integration vector for the integration
mutagenesis of the lysR1 gene

Chromosomal DNA was isolated from the strain ATCC 13032 by
the method of Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 -
1828 (1994)). On account of the sequence of the lysR1 gene
known from Example 2 for *C. glutamicum*, the following
15 oligonucleotides were selected for the polymerase chain
reaction:

lysR1intA:

5`TTC CAA TCC CTG CTG TTC AC 3`

lysR1intB:

20 5`GTG ACC TTT GAA ACC AGC GA 3`

The represented primers were synthesised by MWG Biotech
(Ebersberg, Germany) and the PCR reaction was carried out
according to the standard PCR method of Innis et al. (PCR
protocols. A guide to methods and applications, 1990,
25 Academic Press) using Pwo polymerase from Boehringer. By
means of the polymerase chain reaction a 383 bp long
internal fragment of the lysR1 gene was isolated, which is
shown in SEQ ID No. 3.

The amplified DNA fragment was ligated into the vector
30 pCR2.1-TOPO (Mead et al. (1991) Bio/Technology 9:657-663)
using the TOPO TA Cloning Kit from Invitrogen Corporation
(Carlsbad, CA, USA; Cat. No. K4500-01).

The E. coli strain TOP10F was then transformed with the ligation batch (Hanahan, In: DNA cloning. A practical approach. Vol. I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA, 1985). Plasmid-carrying cells were selected by plating out
5 the transformation batch onto LB agar (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) that had been supplemented with 25 mg/l of kanamycin. Plasmid DNA was isolated from a transformant using the
10 QIAprep Spin Miniprep Kit from Qiagen and was checked by restriction with the restriction enzyme EcoRI followed by agarose gel electrophoresis (0.8%). The plasmid was named pCR2.1lysRlint.

Example 4

15 Integration mutagenesis of the lysR1 gene in the lysine producer DSM 5715

The vector pCR2.1lysRlint mentioned in Example 3 was electroporated into Corynebacterium glutamicum DSM 5715 according to the electroporation method of Tauch et.
20 al. (FEMS Microbiological Letters, 123:343-347 (1994)). The strain DSM 5715 is an AEC-resistant lysine producer. The vector pCR2.1lysRlint cannot replicate independently in DSM 5715 and thus only remains in the cell if it has integrated into the chromosome of DSM 5715. The selection of clones
25 with pCR2.1lysRlint integrated into the chromosome was made by plating out the electroporation batch onto LB agar (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) that had been supplemented with 15 mg/l of
30 kanamycin.

In order to demonstrate the integration the lysRlint fragment was labelled using the Dig Hybridisation Kit from Boehringer according to the method described in "The DIG System User's Guide for Filter Hybridization" published by

Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Germany, 1993). Chromosomal DNA of a potential integrant was isolated according to the method of Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) and was in each case cleaved with
5 the restriction enzymes SalI, SacI and HindIII. The resultant fragments were separated by means of agarose gel electrophoresis and hybridised at 68°C using the Dig Hybridisation Kit from Boehringer. The plasmid
pCR2.1lysRlint mentioned in Example 3 had inserted itself
10 into the chromosome of DSM 5715 within the chromosomal lysR1 gene. The strain was designated DSM 5715::pCR2.1lysRlint.

Example 5

Production of lysine

15 The C. glutamicum strain DSM 5715::pCR2.1lysRlint obtained in Example 4 was cultivated in a nutrient medium suitable for the production of lysine and the lysine content in the culture supernatant was determined.

For this purpose the strain was first of all incubated for
20 24 hours at 33°C on an agar plate with the corresponding antibiotic (brain-heart agar with kanamycin (25 mg/l). Starting from this agar plate culture a preculture was inoculated (10 ml of medium in a 100 ml Erlenmeyer flask). The full medium CgIII was used as medium for the
25 preculture.

Medium Cg III

| | |
|---------------------------------|----------|
| NaCl | 2.5 g/l |
| Bacto-Peptone | 10 g/l |
| Bacto-Yeast Extract | 10 g/l |
| Glucose (autoclaved separately) | 2% (w/v) |

The pH value was adjusted to pH 7.4

Kanamycin (25 mg/l) was added to this preculture. The preculture was then incubated for 24 hours at 33°C at 240 rpm on a shaker table. From this preculture a main culture was inoculated so that the initial OD (660 nm) of the main culture was 0.1 OD. The medium MM was used for the main culture.

Medium MM

| | |
|---|----------|
| CSL (Corn Steep Liquor) | 5 g/l |
| MOPS | 20 g/l |
| Glucose (autoclaved separately) | 50g/l |
| Salts: | |
| (NH ₄) ₂ SO ₄) | 25 g/l |
| KH ₂ PO ₄ | 0.1 g/l |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 1.0 g/l |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 10 mg/l |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 10 mg/l |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 5.0 mg/l |
| Biotin (sterile filtered) | 0.3 mg/l |
| Thiamine.HCl (sterile filtered) | 0.2 mg/l |
| Leucine (sterile filtered) | 0.1 g/l |
| CaCO ₃ | 25 g/l |

CSL, MOPS and the salt solution are adjusted with ammonia water to pH 7 and autoclaved. The sterile substrate and

vitamin solutions as well as the dry autoclaved CaCO_3 are then added.

Cultivation is carried out in a 10 ml volume in a 100 ml Erlenmeyer flask equipped with baffles. Kanamycin was added
5 (25 mg/l). The cultivation was carried out at 33°C and 80% atmospheric humidity.

After 72 hours the OD was determined at a measurement wavelength of 660 nm with a Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, Munich). The amount of lysine formed was
10 determined by ion exchange chromatography and post-column derivatisation with ninhydrin detection using an amino acid analyser from Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Germany).

The results of the experiment are shown in Table 1.

Table 1

| Strain | OD(660) | Lysine-HCl g/l |
|---------------------------|---------|-------------------|
| DSM 5715 | 7.5 | 13.01 |
| DSM 5715:: pCR2.1lysR1int | 7.7 | 15.64 |

SEQUENCE PROTOCOL

<110> Degussa-Hüls AG

5 <120> New nucleotide sequences coding for the lysR1 gene

<130> 000179 BT

<140>

10 <141>

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 1311

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

20

<220>

<221> CDS

<222> (201)..(1109)

<223> lysR1 gene

25

<400> 1

acagcccagg ggccgttgag ggggaaaagc tgcgttccaa tggcagcacc aaattgcagg 60

gatagggcgg aacccatcac catcaacact gcagcggact gtttattcat gcccttgatt 120

30

attgccaaaag aaaccttttaa ggactagatc gaaaaacagc caactatagt taagtaatac 180

tgaacaattt tggaggtgtc gtg ctc aat ctc aac cgc tta cac atc ctg cag 233

35

Met Leu Asn Leu Asn Arg Leu His Ile Leu Gln

1

5

10

gaa ttc cac cgc ctg gga acg att aca gca gtg gcg gaa tcc atg aac 281

Glu Phe His Arg Leu Gly Thr Ile Thr Ala Val Ala Glu Ser Met Asn

15

20

25

40

tac agc cgc tct gcc atc tcc caa caa atg gcg ctg ctg gaa aaa gaa 329

Tyr Ser Arg Ser Ala Ile Ser Gln Gln Met Ala Leu Leu Glu Lys Glu

30

35

40

45

att ggt gtg aaa ctc ttt gaa aaa agc ggc cga aac ctc tac ttc aca 377

Ile Gly Val Lys Leu Phe Glu Lys Ser Gly Arg Asn Leu Tyr Phe Thr

45

50

55

50

gaa caa ggc gaa gtg ttg gcc tca gaa aca cat gcg atc atg gca gca 425

Glu Gln Gly Glu Val Leu Ala Ser Glu Thr His Ala Ile Met Ala Ala

60

65

70

75

55

gtc gac cat gcc cgc gca gcc gtt cta gat tcg ctg tct gaa gtg tcc 473

Val Asp His Ala Arg Ala Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Val Ser

80

85

90

gga acg ctg aaa gtc acc tcc ttc caa tcc ctg ctg ttc acc ctt gcc 521

Gly Thr Leu Lys Val Thr Ser Phe Gln Ser Leu Leu Phe Thr Leu Ala

95

100

105

| | | |
|----|---|------|
| | ccg aaa gcc atc gcg cgc ctg acc gag aaa tac cca cac ctg caa gta | 569 |
| | Pro Lys Ala Ile Ala Arg Leu Thr Glu Lys Tyr Pro His Leu Gln Val | |
| | 110 115 120 | |
| 5 | | |
| | gaa atc tcc caa cta gaa gtc acc gca gcg ctc gaa gaa ctc cgc gcc | 617 |
| | Glu Ile Ser Gln Leu Glu Val Thr Ala Ala Leu Glu Glu Leu Arg Ala | |
| | 125 130 135 | |
| 10 | | |
| | cgc cgc gtc gac gtc gca ctc ggc gag gaa tac ccc gtg gaa gtc ccc | 665 |
| | Arg Arg Val Asp Val Ala Leu Gly Glu Glu Tyr Pro Val Glu Val Pro | |
| | 140 145 150 155 | |
| 15 | | |
| | ctt gtt gag gcc agc att cac cgc gaa gtc ctc ttc gaa gac ccc atg | 713 |
| | Leu Val Glu Ala Ser Ile His Arg Glu Val Leu Phe Glu Asp Pro Met | |
| | 160 165 170 | |
| 20 | | |
| | ctg ctc gtc acc cca gca agc ggc cca tac tct ggc ctc acc ctg cca | 761 |
| | Leu Leu Val Thr Pro Ala Ser Gly Pro Tyr Ser Gly Leu Thr Leu Pro | |
| | 175 180 185 | |
| 25 | | |
| | gaa ctc cgc gac atc ccc atc gcc atc gat cca ccc gac ctt ccc gcg | 809 |
| | Glu Leu Arg Asp Ile Pro Ile Ala Ile Asp Pro Pro Asp Leu Pro Ala | |
| | 190 195 200 | |
| 30 | | |
| | ggc gaa tgg gtc cat agg ctc tgc cgg cgc gcc ggg ttt gag ccc cgc | 857 |
| | Gly Glu Trp Val His Arg Leu Cys Arg Arg Ala Gly Phe Glu Pro Arg | |
| | 205 210 215 | |
| 35 | | |
| | gtg acc ttt gaa acc agc gat ccc atg ctc caa gca cac ctc gtg cgt | 905 |
| | Val Thr Phe Glu Thr Ser Asp Pro Met Leu Gln Ala His Leu Val Arg | |
| | 220 225 230 235 | |
| 40 | | |
| | agc ggc ttg gcc gtg aca ttt tcc ccc aca ctg ctc acc ccg atg ctg | 953 |
| | Ser Gly Leu Ala Val Thr Phe Ser Pro Thr Leu Leu Thr Pro Met Leu | |
| | 240 245 250 | |
| 45 | | |
| | gaa agc gtg cac atc cag ccg ctg ccc ggc aac ccc acg cgc acg ctc | 1001 |
| | Glu Ser Val His Ile Gln Pro Leu Pro Gly Asn Pro Thr Arg Thr Leu | |
| | 255 260 265 | |
| 50 | | |
| | tac acc gcg gtc agg gaa ggg cgc cag ggg cat cca gcc att aaa gct | 1049 |
| | Tyr Thr Ala Val Arg Glu Gly Arg Gln Gly His Pro Ala Ile Lys Ala | |
| | 270 275 280 | |
| 55 | | |
| | ttt cga cga gcc ctc gcc cat gtg gcc aaa gaa tct tat ttg gag gct | 1097 |
| | Phe Arg Arg Ala Leu Ala His Val Ala Lys Glu Ser Tyr Leu Glu Ala | |
| | 285 290 295 | |
| 60 | | |
| | cgt cta gta gag tgagttcttg tgagccttca gacaaatcat cgcccagtac | 1149 |
| | Arg Leu Val Glu | |
| | 300 | |
| 65 | | |
| | tcgtcgttga cttcggcgca cagtacgcgc agctgatcgc acgtcgtgtg cgtgaggccg | 1209 |
| 70 | | |
| | gcatctactc cgaagtcac cgcacaccg ccaccgcaga cgatgtgcgc gctaaaaatg | 1269 |
| 75 | | |
| | cagcagccct cgtcctttcc ggtggcccat cctccgtgta tg | 1311 |

<210> 2
 <211> 303
 <212> PRT
 5 <213> *Corynebacterium glutamicum*

 <400> 2
 Met Leu Asn Leu Asn Arg Leu His Ile Leu Gln Glu Phe His Arg Leu
 1 5 10 15
 10 Gly Thr Ile Thr Ala Val Ala Glu Ser Met Asn Tyr Ser Arg Ser Ala
 20 25 30
 15 Ile Ser Gln Gln Met Ala Leu Leu Glu Lys Glu Ile Gly Val Lys Leu
 35 40 45
 Phe Glu Lys Ser Gly Arg Asn Leu Tyr Phe Thr Glu Gln Gly Glu Val
 50 55 60
 20 Leu Ala Ser Glu Thr His Ala Ile Met Ala Ala Val Asp His Ala Arg
 65 70 75 80
 Ala Ala Val Leu Asp Ser Leu Ser Glu Val Ser Gly Thr Leu Lys Val
 85 90 95
 25 Thr Ser Phe Gln Ser Leu Leu Phe Thr Leu Ala Pro Lys Ala Ile Ala
 100 105 110
 30 Arg Leu Thr Glu Lys Tyr Pro His Leu Gln Val Glu Ile Ser Gln Leu
 115 120 125
 Glu Val Thr Ala Ala Leu Glu Glu Leu Arg Ala Arg Arg Val Asp Val
 130 135 140
 35 Ala Leu Gly Glu Glu Tyr Pro Val Glu Val Pro Leu Val Glu Ala Ser
 145 150 155 160
 Ile His Arg Glu Val Leu Phe Glu Asp Pro Met Leu Leu Val Thr Pro
 165 170 175
 40 Ala Ser Gly Pro Tyr Ser Gly Leu Thr Leu Pro Glu Leu Arg Asp Ile
 180 185 190
 45 Pro Ile Ala Ile Asp Pro Pro Asp Leu Pro Ala Gly Glu Trp Val His
 195 200 205
 Arg Leu Cys Arg Arg Ala Gly Phe Glu Pro Arg Val Thr Phe Glu Thr
 210 215 220
 50 Ser Asp Pro Met Leu Gln Ala His Leu Val Arg Ser Gly Leu Ala Val
 225 230 235 240
 Thr Phe Ser Pro Thr Leu Leu Thr Pro Met Leu Glu Ser Val His Ile
 245 250 255
 55 Gln Pro Leu Pro Gly Asn Pro Thr Arg Thr Leu Tyr Thr Ala Val Arg
 260 265 270
 Glu Gly Arg Gln Gly His Pro Ala Ile Lys Ala Phe Arg Arg Ala Leu

275

280

285

Ala His Val Ala Lys Glu Ser Tyr Leu Glu Ala Arg Leu Val Glu
 290 295 300

5

<210> 3

<211> 383

10

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> lysRlint-Fragment

15

<400> 3

20

```

ttccaatccc tgctgttcac ccttgccccg aaagccatcg cgcgctgac cgagaaatac 60
ccacacctgc aagtagaaat ctcccaacta gaagtcaccg cagcgctcga agaactccgc 120
gcccgcgcgc tcgacgtcgc actcggcgag gaataccccg tggaagtccc ccttggtgag 180
gccagcattc accgcgaagt cctcttcgaa gaccccatgc tgctcgtcac cccagcaagc 240
ggcccatact ctggcctcac cctgccagaa ctccgcgaca tcccatcgc catcgatcca 300
cccgaccttc ccgcgggcga atgggtccat aggctctgcc ggcgcgccgg gtttgagccc 360
cgcgtgacct ttgaaaccag cga                                     383

```

The following figures are enclosed:

Fig. 1: Map of the plasmid pCR2.1lysRlint.

The acronyms and abbreviations used have the following meanings.

| | |
|------------|--|
| KmR: | Kanamycin resistance gene |
| EcoRI: | Cleavage site of the restriction enzyme EcoRI |
| lysRlint: | Internal fragment of the lysR1 gene |
| ColE1 ori: | Replication origin of the plasmid ColE1 |

Patent Claims

1. An isolated polynucleotide from coryneform bacteria containing a polynucleotide sequence coding for the
5 lysR1 gene, selected from the group comprising
 - a) polynucleotide that is at least 70% identical to a polynucleotide coding for a polypeptide that contains the amino acid sequence of SEQ ID No. 2,
 - 10 b) polynucleotide coding for a polypeptide that contains an amino acid sequence that is at least 70% identical to the amino acid sequence of SEQ ID No. 2,
 - c) polynucleotide that is complementary to the polynucleotides of a) or b), and
 - 15 d) polynucleotide containing at least 15 successive nucleotides of the polynucleotide sequence of a), b) or c),

the polypeptide preferably having the activity of the transcription regulator lysR1.
- 20 2. A polynucleotide as claimed in claim 1, wherein the polynucleotide is a preferably recombinant DNA replicable in coryneform bacteria.
3. A polynucleotide as claimed in claim 1, wherein the polynucleotide is an RNA.
- 25 4. Replicable DNA as claimed in claim 2, containing
 - (i) the nucleotide sequence shown in SEQ ID No. 1, or
 - (ii) at least one sequence that corresponds to the sequence (i) within the region of degeneration of the genetic code, or

(iii) at least one sequence that hybridises with the sequences complementary to the sequences (i) or (ii), and optionally

(iv) functionally neutral sense mutations in (i).

- 5 5. A polynucleotide as claimed in claim 2, containing the nucleic acid sequence as shown in SEQ ID No. 1.
6. Coryneform bacteria in which the lysR1 gene is attenuated, preferably switched off.
- 10 7. A process for the production of L-amino acid, in particular L-lysine, wherein the following steps are carried out:
 - a) fermentation of the bacteria producing the desired L-amino acid, in which at least the lysR1 gene is attenuated,
 - 15 b) accumulation of the desired product in the medium or in the cells of the bacteria, and
 - c) isolation of the L-amino acid.
- 20 8. A process as claimed in claim 7, wherein bacteria are used in which in addition further genes of the biosynthesis pathway of the desired L-amino acid are enhanced.
- 25 9. A process as claimed in claim 7, wherein bacteria are used in which the metabolic pathways that reduce the formation of the desired L-amino acid are at least partially switched off.
10. A process as claimed in claim 7, wherein the expression of the polynucleotide(s) that codes/code for the lysR1 gene is attenuated, in particular is switched off.

11. A process as claimed in claim 7, wherein the regulatory properties of the polypeptide that codes for the polynucleotide lysR1 codes are reduced.
- 5 12. A process as claimed in claim 7, wherein for the production of L-amino acids, in particular L-lysine, bacteria are fermented in which simultaneously one or more of the genes selected from the following group is/are enhanced, preferably overexpressed.
 - 10 12.1 The gene dapA coding for dihydrodipicolinate synthase,
 - 12.2 the gene eno coding for enolase,
 - 12.3 the gene zwf coding for the zwf gene product,
 - 12.4 the gene pyc coding for pyruvate carboxylase,
 - 12.5 the gene lysE coding for lysine export.
- 15 13. A process as claimed in claim 7, wherein one or more of the genes selected from the following group is simultaneously attenuated:
 - 13.1 the gene pck coding for phosphoenol pyruvate carboxykinase
 - 20 13.2 the gene pgi coding for glucose-6-phosphate isomerase
 - 13.3 the gene poxB coding for pyruvate oxidase.
14. A process as claimed in one or more of the preceding claims, wherein microorganisms of the species
25 *Corynebacterium glutamicum* are used.
15. A process for detecting RNA, cDNA and DNA in order to isolate nucleic acids, polynucleotides or genes that code for the transcription regulator lysR1 or that have a high degree of affinity to the sequence of the

lysR1 gene, wherein the polynucleotide sequences as claimed in claims 1 to 4 are used as hybridisation probes.

New Nucleotide Sequences Coding for the lysR1 Gene**Abstract**

Isolated polynucleotide containing a polynucleotide sequence selected from the group

- 5 a) polynucleotide that is at least 70% identical to a polynucleotide coding for a polypeptide that contains the amino acid sequence of SEQ ID No. 2,
- b) polynucleotide coding for a polypeptide that contains
10 an amino acid sequence that is at least 70% identical to the amino acid sequence of SEQ ID No. 2,
- c) polynucleotide that is complementary to the polynucleotides of a) or b), and
- d) polynucleotide containing at least 15 successive
15 nucleotides of the polynucleotide sequence of a), b) or c),

and a process for the enzymatic production of L-amino acids using coryneform bacteria in which at least the lysR1 gene is present in attenuated form, and the use of the polynucleotide sequences as hybridisation probes.

Fig. 1: Plasmid Map of pCR2.1lysR1int

